

=> s jp2001299140/pn
L5 1 JP2001299140/PN

=> d bib abs

L5 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN
AN 2002-075087 [10] WPIDS Full-text
DNN N2002-055425 DNC C2002-022320
TI Human CD-81 transgenic non-human animal and cells for detecting and
researching hepatitis C.
DC B04 D16 P14 S03
IN MIYAZAKI, T; OHNISHI, S
PA (SUMU) SUMITOMO SEIYAKU KK; (SUMU) SUMITOMO PHARM CO LTD
CYC 22
PI WO 2001080632 A1 20011101 (200210)* JA 42
RW: AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR
W: CA US
JP 2001299140 A 20011030 (200210) 14<--
ADT WO 2001080632 A1 WO 2001-JP3409 20010420; JP 2001299140 A JP 2000-122486
20000424
PRAI JP 2000-122486 20000424
AN 2002-075087 [10] WPIDS Full-text
AB WO 200180632 A UPAB: 20020213

NOVELTY - Human CD-81 transgenic non-human animal, is new.

DETAILED DESCRIPTION - Human CD-81 transgenic non-human animals amplify Hepatitis C virus (HCV) via HCV infection. Also claimed are a method for screening for substances that control HCV expression, the substances themselves and medical compositions containing them.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (1) a method for producing the animals;
- (2) non-human liver cells expressing human CD81; and
- (3) a method for amplifying HCV.

USE - The Human CD-81 transgenic non-human animal is useful for detecting hepatitis C virus, researching the mechanism for infection, and for screening for new substances for preventing and curing hepatitis C. Dwg.0/2

=> log h

COST IN JAPANESE YEN

SINCE FILE	TOTAL
ENTRY	SESSION
6576	6630

FULL ESTIMATED COST

SESSION WILL BE HELD FOR 60 MINUTES
STN INTERNATIONAL SESSION SUSPENDED AT 11:18:57 ON 07 AUG 2006

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-299140
(P2001-299140A)

(43) 公開日 平成13年10月30日 (2001. 10. 30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 1/16		A 6 1 P 1/16	4 B 0 6 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 Q 1/48	Z 4 B 0 6 5
15/09	Z N A	1/70	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 請求項の数36 O L (全 14 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-122486 (P2000-122486)

(22) 出願日 平成12年4月24日 (2000. 4. 24)

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 宮崎 徹

長崎県島原市城内1-1188

(72) 発明者 大西 真

東京都文京区本郷5-29-12 赤門ロイヤルハイツ1301号

(74) 代理人 10010/984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HCVを増幅しうる細胞及び非ヒト動物

(57) 【要約】

【課題】 C型肝炎の予防・治療剤のスクリーニングに有用であるHCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物や、HCV感染によりHCVを増幅しうる非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞を提供すること。

【解決手段】 ヒトCD81遺伝子を非ヒト動物の受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親非ヒト動物の輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔非ヒト動物から前記ヒトCD81遺伝子を有する仔非ヒト動物を選択し、ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物を得る。ヒトCD81をコードするcDNA等を含む発現ベクターを、マーカー遺伝子といっしょに非ヒト動物肝臓由来の樹立細胞にトランスフェクションし、ヒトCD81を安定発現する樹立細胞を選択し、非ヒト動物肝臓由来の樹立細胞を得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 HCV感染によりHCVを増幅しうることを特徴とするヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項2】 ヒトCD81遺伝子が導入されていることを特徴とする請求項1記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項3】 本来備えているCD81遺伝子機能が染色体上で欠損し、かつヒトCD81遺伝子が導入されていることを特徴とする請求項1又は2記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項4】 非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項5】 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項4記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項6】 マウスが、C3H系統マウスであることを特徴とする請求項5記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項7】 ヒトCD81遺伝子を非ヒト動物の受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親非ヒト動物の輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔非ヒト動物から前記ヒトCD81遺伝子を有する仔非ヒト動物を選択することを特徴とするHCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物の製造方法。

【請求項8】 ヒトCD81遺伝子を非ヒト動物の受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親非ヒト動物の輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔非ヒト動物から前記ヒトCD81遺伝子を有する仔非ヒト動物を選択することにより得られるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物と、非ヒト動物に備わったCD81遺伝子が染色体上で欠損した非ヒト動物とを戻し交配し、非ヒト動物CD81遺伝子機能が染色体上で欠損し、かつヒトCD81遺伝子が導入されている産仔を得ることを特徴とするHCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物の製造方法。

【請求項9】 請求項7又は8記載のHCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物の製造方法により得られることを特徴とするヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項10】 HCV感染によりHCVを増幅しうることを特徴とする非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞。

【請求項11】 非ヒト動物が、HCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物であることを特徴とする請求項10記載の非ヒト動物

肝臓由来のヒトCD81発現細胞。

【請求項12】 ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物が、本来備えているCD81遺伝子機能が染色体上で欠損し、かつヒトCD81遺伝子が導入されているヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物であることを特徴とする請求項11記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞。

【請求項13】 ヒトCD81遺伝子を導入した樹立細胞であることを特徴とする請求項10記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞。

【請求項14】 非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項10～13のいずれか記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞。

【請求項15】 齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項14記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞。

【請求項16】 マウスが、C3H系統マウスであることを特徴とする請求項15記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞。

【請求項17】 ヒトCD81をコードするcDNAと、プロモーターと、エンハンサーとを含む発現ベクターを、マーカー遺伝子といっしょに非ヒト動物肝臓由来の樹立細胞にトランスフェクションし、該トランスフェクションされた細胞を培養し、ヒトCD81を安定発現する樹立細胞を選択することを特徴とするHCVを増幅しうる非ヒト動物肝臓由来の樹立細胞の製造方法。

【請求項18】 ヒトCD81遺伝子を発現することができる非ヒト動物肝臓由来の樹立細胞とHCVとをインビトロで接触せしめることを特徴とするHCVの増幅方法。

【請求項19】 請求項10～16のいずれか記載の非ヒト肝臓由来の細胞と被検物質とをインビトロで接触させる前後に、HCVを感染させ、次いで該細胞株におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項20】 請求項1～6のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られる肝細胞又は肝組織をHCVの存在下で培養し、肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項21】 請求項1～6のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、HCVを感染させ、該感染後の非ヒト動物から得られる肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項22】 請求項1～6のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物をあらかじめHCVに感染させた後、該非ヒト動物から得られる肝細胞又は肝組織を被検物質の存在下で培養し、該肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項23】 請求項1～6のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物をあらかじめHCVに感染させた後、被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られる肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項24】 HCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価が、肝細胞におけるHCV遺伝子の測定・評価であることを特徴とする請求項19～23のいずれか記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項25】 請求項1～6のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与する前後に、HCVを感染させ、該非ヒト動物におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項26】 HCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価が、非ヒト動物から得られる肝臓における肝炎の病理組織像の解析・評価であることを特徴とする請求項25記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項27】 HCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価が、非ヒト動物から得られる血清中のHCV遺伝子、酵素活性又は抗体価の測定・評価であることを特徴とする請求項25記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項28】 血清中の酵素が、アラニンアミノトランスフェラーゼ又はアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼであることを特徴とする請求項27記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項29】 HCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価するに際し、ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することを特徴とする請求項19～28のいずれか記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項30】 請求項19～29のいずれか記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とする

HCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質。

【請求項31】 HCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質が、CD81に対するアゴニストであることを特徴とする請求項30記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質。

【請求項32】 請求項19～29のいずれか記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質。

【請求項33】 HCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質が、CD81に対するアンタゴニストであることを特徴とする請求項32記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質。

【請求項34】 HCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質が、C型肝炎に対する予防剤、抑制剤若しくは治療剤、又は肝臓癌に対する予防剤、抑制剤若しくは治療剤であることを特徴とする請求項32記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質。

【請求項35】 HCVの発現及び／又は増幅・複製の促進を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項30又は31記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質を含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項36】 HCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項32～34のいずれか記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質を含有することを特徴とする医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、HCV（C型肝炎ウイルス）感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物や、HCV感染によりHCVを増幅しうる非ヒト動物肝臓由来の細胞や、これらHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物やHCV感染によりHCVを増幅しうる非ヒト動物肝臓由来の細胞を用いたHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法や、かかるスクリーニング方法により得られるHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質や、これらを有効成分とする医薬組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】非A非B型肝炎の主要な原因ウイルスであるHCV（C型肝炎ウイルス）の遺伝子は、1988年にアメリカのカイロン社の研究陣により全長約9500塩基をもつRNA遺伝子としてクローニングがなされ、この一本鎖RNA遺伝子に基づいて作製された組換え蛋白（C100-3抗原）を用いたヒト血清中の抗体測定系が開発され、HCV肝炎の血清学的診断方法が既に確立されている。このHCVはフラビウイルス科に属

し、そのゲノム全体の90%を占める1つのORF (open reading frame; 蛋白質読み枠) は、構造蛋白領域 (5' 側からC領域、E1領域、E2領域、p7領域) とその下流に位置する非構造蛋白領域 (5' 側からNS2領域、NS3領域、NS4領域、NS5領域) とから構成され、C領域はウイルス粒子の内核の糖鎖のないコア蛋白を、E1及びE2領域は外被糖蛋白 (エンベロープ蛋白) を、NS3領域はウイルス複製に必要なプロテアーゼ活性を、NS5領域はRNAポリメラーゼ活性をコードしていることが知られている。

【0003】HCV感染は長期慢性化する特徴があり、これに伴って慢性肝炎を引き起こし、その後肝硬変、そして肝臓癌へと進行する割合が非常に高いことが大きな問題となっている。したがって、現在はいかに感染しているHCVを排除するか、そしてHCV感染による疾病を防ぐかといった点が課題となっている。これらの問題を解決するには、まずHCVの生活環を解明することが重要であることは明らかであるが、HCVのウイルス学的研究には依然として大きな壁が存在している。それはHCVが感染可能な実験動物は、使用に大きな制限、すなわち、実験に要する費用や実験に利用できる頭数に限りがあるチンパンジーだけであり、また培養細胞を用いた効率の高いHCV感染増幅系がないことであった。この問題を解決するために、近年、C型肝炎治療剤の開発のためのC型肝炎モデル動物、すなわち、HCVの全cDNAが血清アミロイドP成分 (SAP) プロモーター遺伝子の下流側に挿入されているDNA配列を含むDNAを導入したトランスジェニック動物 (特開平9-9965号公報) や、HCV由来のcDNAが導入されているC型肝炎モデル動物 (特開平10-84813号公報) や、HCVコア蛋白をコードする遺伝子が導入されたマウス又はその子孫 (特開平11-123035号公報) や、ヒトHCV遺伝子を動物の分化前能性を有する細胞に導入してその遺伝子を発現する形質転換マウス (特開平11-266739号公報) 等のC型肝炎モデル動物が報告されている。しかし、これらのモデル動物において実際に肝炎が発症したという報告はなされていない。

【0004】また、HCV感染治療法としては、現在ではインターフェロン (IFN) 療法が有効とされている。このIFNは、細胞表面に存在するIFNレセプターを介して肝細胞内でウイルスの増幅・複製を阻止する抗ウイルス性蛋白の合成を促進したり、あるいは免疫エフェクター細胞を活性化してHCV感染細胞の排除に働くと考えられているが、C型慢性肝炎の完全著効率は約30%に留まっている。例えば、HCV遺伝子型が1b以外の患者、HCV感染からの期間が短い患者、血中のHCV-RNA量が少ない患者、慢性肝炎の肝病理組織像が軽度である患者などは、IFN治療効果が期待できるとされている。しかし、組換えIFNに対する抗体の

出現は25%程度であり、治療の阻害原因にもなっている。また、IFNにはインフルエンザ様症状、うつ状態誘導、甲状腺機能異常、血小板減少症、発疹、脱毛などの副作用が認められているなどの問題があった。

【0005】最近、アメリカのカイロン社の研究陣により、HCVのエンベロープ蛋白E2領域をプローブとしてヒトTリンパ種 (E2との結合性が高い細胞クローン) 由来cDNA発現ライブラリーからE2結合分子のスクリーニングが行われ、ヒトCD81分子がE2と結合することや、かかるCD81分子上のE2結合領域がHCVのRNAと結合し、この結合がHCV感染を中和する抗体により阻害されることが報告されている (Science 282, 938-941, 1998)。また、HCVのE2はヒトCD81を発現する細胞と特異的に結合するが、他のテトラスパニン (tetraspanin) ファミリー (CD9、CD63及びCD151) を発現する細胞とは結合せず、E2の結合量がヒトCD81を発現させたラットRBL (白血病細胞) やKM3 (黒色腫細胞) とヒト細胞とで違いがなかったことから、E2の細胞表面との初期反応 (結合) にはCD81以外のヒト細胞特異的な因子は必要とされないことや、このCD81の細胞外領域 (EC2) 中にE2との反応 (結合) を決定づけている特定の4つのアミノ酸が存在することや、CD81の構造はE2の認識に重要であることや、E2内のCD81との反応 (結合) 領域に480、493、544、551のアミノ酸が含まれることや、E2とCD81の反応 (結合) は細胞機能を改変することが報告されている (J. Virol. 73, 6235-6244, 1999)。

【0006】他方、各種ウイルスレセプターのトランスジェニック動物が作製されてきたが、ウイルス感染が成立して有用なモデルになったものもあれば、感染が成立しなかったものもある。例えば、ヒトCD4とヒトCCR5を同時に発現させた動物細胞の場合、HIV-1は細胞内に浸入するが、細胞内で複製するか否かは動物種によって異なる可能性が示唆されており、ヒトCD81を発現させたトランスジェニック動物を作製できたとしてもHCVに感染するか否かはやってみないとわからないとの報告もなされている (Hepatology 29, 990-992, 1999)。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】C型肝炎の予防・治療剤の開発は、HCV感染の防止、HCV感染による肝硬変及び肝臓癌の治療などHCVに起因する疾病の治療に不可欠であるが、HCVはヒトとチンパンジーにしか感染しないことから、C型肝炎の予防・治療剤の研究開発のための動物実験としては、現在のところ、C型肝炎患者の血清をチンパンジーに注入して発症させる系しかなく、C型肝炎の予防・治療剤の開発のみならず、動物愛護の点からも問題があった。また従来、HCVを増幅しうるヒト及びチンパンジー以外の動物や、HCV感染に

よりHCVを持続して増幅しうるヒト及びチンパンジー以外の細胞は知られていなかった。

【0008】本発明の課題は、かかるC型肝炎の予防・治療剤のスクリーニングに有用であるHCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物や、HCV感染によりHCVを増幅しうる非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞を提供することにある。また、本発明の課題は、上記HCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物や、HCVを増幅しうる非ヒト動物肝臓由来の細胞を用いたHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法や、かかるスクリーニング方法により得られるHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質や、これらを有効成分とする医薬組成物などを提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、マウス肝臓細胞又はマウス由来の受精卵にヒトCD81遺伝子を導入することにより、ヒトCD81導入遺伝子発現細胞又はヒトCD81トランスジェニックマウスを作製し、これらヒトCD81導入遺伝子発現細胞又はヒトCD81トランスジェニックマウスをHCVに感染させると、これらの肝細胞においてHCVが増幅しうることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち本発明は、HCV感染によりHCVを増幅しうることを特徴とするヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物（請求項1）や、ヒトCD81遺伝子が導入されていることを特徴とする請求項1記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物（請求項2）や、本来備えているCD81遺伝子機能が染色体上で欠損し、かつヒトCD81遺伝子が導入されていることを特徴とする請求項1又は2記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物（請求項3）や、非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物（請求項4）や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項4記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物（請求項5）や、マウスが、C3H系統マウスであることを特徴とする請求項5記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物（請求項6）に関する。

【0011】また本発明は、ヒトCD81遺伝子を非ヒト動物の受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親非ヒト動物の輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔非ヒト動物から前記ヒトCD81遺伝子を有する仔非ヒト動物を選択することを特徴とするHCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物の製造方法（請求項7）や、ヒトCD81遺伝子を非ヒト動物の受精卵の雄性前核にマイクロインジェク

ションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親非ヒト動物の輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔非ヒト動物から前記ヒトCD81遺伝子を有する仔非ヒト動物を選択することにより得られるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物と、非ヒト動物に備わったCD81遺伝子が染色体上で欠損した非ヒト動物とを戻し交配し、非ヒト動物CD81遺伝子機能が染色体上で欠損し、かつヒトCD81遺伝子が導入されている産仔を得ることを特徴とするHCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物の製造方法（請求項8）や、請求項7又は8記載のHCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物の製造方法により得られることを特徴とするヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物（請求項9）に関する。

【0012】また本発明は、HCV感染によりHCVを増幅しうることを特徴とする非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞（請求項10）や、非ヒト動物が、HCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物であることを特徴とする請求項10記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞（請求項11）や、ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物が、本来備えているCD81遺伝子機能が染色体上で欠損し、かつヒトCD81遺伝子が導入されているヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物であることを特徴とする請求項11記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞（請求項12）や、ヒトCD81遺伝子を導入した樹立細胞であることを特徴とする請求項10記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞（請求項13）や、非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項10～13のいずれか記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞（請求項14）や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項14記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞（請求項15）や、マウスが、C3H系統マウスであることを特徴とする請求項15記載の非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞（請求項16）に関する。

【0013】また本発明は、ヒトCD81をコードするcDNAと、プロモーターと、エンハンサーとを含む発現ベクターを、マーカー遺伝子といっしょに非ヒト動物肝臓由来の樹立細胞にトランスフェクションし、該トランスフェクションされた細胞を培養し、ヒトCD81を安定発現する樹立細胞を選択することを特徴とするHCVを増幅しうる非ヒト動物肝臓由来の樹立細胞の製造方法（請求項17）や、ヒトCD81遺伝子を発現することができる非ヒト動物肝臓由来の樹立細胞とHCVとをインビトロで接触せしめることを特徴とするHCVの増幅方法（請求項18）に関する。

【0014】また本発明は、請求項10～16のいずれ

か記載の非ヒト肝臓由来の細胞と被検物質とをインビトロで接触させる前後に、HCVを感染させ、次いで該細胞株におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項19）や、請求項1～6のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られる肝細胞又は肝組織をHCVの存在下で培養し、肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項20）や、請求項1～6のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、HCVを感染させ、該感染後の非ヒト動物から得られる肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項21）や、請求項1～6のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物をあらかじめHCVに感染させた後、該非ヒト動物から得られる肝細胞又は肝組織を被検物質の存在下で培養し、該肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項22）や、請求項1～6のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物をあらかじめHCVに感染させた後、被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られる肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項23）や、HCVの発現及び／又は増幅・複製の程度の測定・評価が、肝細胞におけるHCV遺伝子の測定・評価であることを特徴とする請求項19～23のいずれか記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項24）や、請求項1～6のいずれか記載のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与する前後に、HCVを感染させ、該非ヒト動物におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価することを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項25）や、HCVの発現及び／又は増幅・複製の程度の測定・評価が、非ヒト動物から得られる肝臓における肝炎の病理組織像の解析・評価であることを特徴とする請求項25記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項26）や、HCVの発現及び／又は増幅・複製の程度の測定・評価が、非ヒト動物から得られる血清中のHCV遺伝子、酵素活

性又は抗体価の測定・評価であることを特徴とする請求項25記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項27）や、血清中の酵素が、アラニンアミノトランスフェラーゼ又はアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼであることを特徴とする請求項27記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項28）や、HCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価するに際し、ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することを特徴とする請求項19～28のいずれか記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項29）に関する。

【0015】また本発明は、請求項19～29のいずれか記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質（請求項30）や、HCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質が、CD81に対するアゴニストであることを特徴とする請求項30記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質（請求項31）や、請求項19～29のいずれか記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とするHCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質（請求項32）や、HCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質が、CD81に対するアンタゴニストであることを特徴とする請求項32記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質（請求項33）や、HCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質が、C型肝炎に対する予防剤、抑制剤若しくは治療剤、又は肝臓癌に対する予防剤、抑制剤若しくは治療剤であることを特徴とする請求項32記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質（請求項34）や、HCVの発現及び／又は増幅・複製の促進を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項30又は31記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質を含有することを特徴とする医薬組成物（請求項35）や、HCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項32～34のいずれか記載のHCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質を含有することを特徴とする医薬組成物（請求項36）に関する。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明においてHCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物とは、ヒトCD81を発現することができるように、ヒトCD81遺伝子の導入など非ヒト動物におけるゲノムが改変されており、HCV含有血清の静脈注射

等のHCV感染により非ヒト動物の肝細胞へ侵入したHCVが、該肝細胞内で増幅することができる非ヒト動物をいう。肝細胞内で増幅しているかどうかは、増幅・複製の結果を示す細胞内のHCV(-)鎖を検出することにより確認することができる。また、HCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物が、C型慢性肝炎を起こしうることは、血中のHCV由来のRNAやタンパクの検出、肝臓の病理組織像等により確認することができる。そして、上記非ヒト動物としては、マウス、ラット、ウサギ等を具体的に例示することができるが、創製、育成、使用の簡便さなどからしてマウス、ラット等の齧歯目動物、特にマウスを用いることが好ましい。また、マウスとしては、C3H系統のマウスを用いることが好ましい。かかるHCV感染によりHCVを増幅することができるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物の作製方法について、ヒトCD81トランスジェニックマウスの場合を例に挙げて説明する。

【0017】ヒトCD81遺伝子の発現産物をコードするcDNA(例えば、EMBL/GenbankデータベースAccession No. M33690)を、エンハンサーとプロモーター、例えばCMV-エンハンサーとチキン β -アクチンプロモーターの下流に、かつポリAシグナル配列、例えばラビット β -グロビンポリAの上流に挿入した導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の雄性前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりトランスジェニックマウスを創製することができる。受精卵への遺伝子の導入方法は特に限定されるものではなく、マイクロインジェクション法の代わりにエレクトロポレーション法等を用いてもよく、また注入する導入遺伝子の数は受精卵1個当たり、例えば、200~1000分子が好ましい。そして、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗DNAを抽出し、導入したヒトCD81遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。なお、本発明においては、ヒトCD81遺伝子の発現産物をコードするcDNAに代えて、チンパンジーCD81遺伝子の発現産物をコードするcDNAを用いることができる。以上のようなトランスジェニックマウスは、例えば「新遺伝子工学ハンドブック」269-276、羊土社(1996)や、「マウス胚の操作マニュアル」近代出版(1989)などの基本書に従って創製することができる。

【0018】また、免疫寛容の問題を回避するために、所望の時期にヒトCD81を発現させることができる発現システム、例えば、P1ファージの組換え酵素Creと、34塩基からなる特異的認識配列loxPとを用い

たCre/loxP発現システム(J. Molecular Biology 150, 467-486, 1981、J. Molecular Biology 150, 487-507, 1981、「マウスラボマニュアル 遺伝子の導入と解析を中心に」P245-250)により、ヒトCD81トランスジェニックマウスを創製することもできる。すなわち、プロモーター遺伝子と2つのloxP配列とそのloxP配列間に挿入されたマーカー遺伝子を含むベクター、例えば、pCALNL5、pCALNLW、pCALN/pBR等のベクターにおいて、下流側loxP配列の下流にヒトCD81のcDNAを挿入し、このヒトCD81のcDNAが挿入されたベクターをマイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法等の方法で受精卵に導入し、導入後の受精卵を仮親の輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記ベクターのDNAを有する仔マウスを選択することにより、所望の時期にヒトCD81を発現させることができるトランスジェニックマウスを創製することができる。このヒトCD81由来の導入遺伝子はスイッチング発現機能を有するので、ヒトCD81トランスジェニックマウスにおいてヒトCD81を発現させる場合、当該cDNAの発現を抑制しているloxP間の配列を除去すればよく、除去する方法としては、Cre組換え酵素を用いる方法、例えば、Creを発現するCre遺伝子組換えアデノウイルス(理研ジーンバンクRDB-1748)を感染させる方法等を挙げることができる。

【0019】上記マウスの受精卵としては、例えば、129/sv、C57BL/6、BALB/c、C3H、SJL/Wt、DBA/1、DBA/2等に由来するマウスの交配により得られるものならばどのようなものでもよいが、トランスジェニックマウスを効率的に作製しうる点で、F1(雑種第一代)マウスの受精卵を用いることが好ましい。また、このようにして得られたヒトCD81トランスジェニックマウスを、マウスCD81欠損マウス(EMBO J. 16, 4217, 1997)と戻し交配させ、マウスCD81が欠損したヒトCD81トランスジェニックマウスを作製することができる。上記マウスCD81欠損マウスは、「ジーンターゲットング」羊土社(1995)や、「新遺伝子工学ハンドブック」277-283、羊土社(1996)に従い作製することができる。そして、マウスCD81が欠損したヒトCD81トランスジェニックマウスは、HCVの感染効率を高めると考えられる点で好ましい。

【0020】本発明においてHCV感染によりHCVを増幅しうる非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞とは、ヒトCD81を発現することができるように、ヒトCD81遺伝子の導入など非ヒト動物肝臓由来の細胞におけるゲノムが改変されており、例えばHCV含有血清の共存下での培養などのHCVのインビトロ感染により、非ヒト動物の肝臓由来の細胞へ侵入したHCVが、

該肝臓由来の細胞内で増幅することができる非ヒト動物肝臓由来の細胞をいう。したがって、ヒトCD81遺伝子を発現することができる非ヒト動物肝臓由来の樹立細胞とHCVとをインビトロで接触せしめることにより、HCVを増幅することができる。また、上記非ヒト動物としては、マウス、ラット、ウサギ等を具体的に例示することができるが、創製、育成、使用の簡便さなどからしてマウス、ラット等の齧歯目動物、特にマウスの肝臓由来の細胞が好ましく、マウスとしてはC3H系統マウスを用いることがより好ましい。

【0021】かかるHCV感染によりHCVを増幅することができる非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞としては、HCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物の肝臓から得られる細胞、特にヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物が本来備えているCD81遺伝子機能が染色体上で欠損し、かつヒトCD81遺伝子が導入されているヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物の肝臓から得られる細胞や、肝臓由来の腫瘍細胞等を不死化細胞として樹立した細胞株にヒトCD81遺伝子を導入した細胞株を例示することができる。また、上記肝臓由来の腫瘍細胞としては、C3H[マウス肝癌細胞、東京大学の大西博士より分与]が好ましく、それ以外にも、Hepa1-6(マウス肝癌細胞、ATCC CRL-1830)、Hepa-1c1c7(マウス肝癌細胞、ATCC CRL-2026)等を例示することができる。かかる肝臓由来の腫瘍細胞等にヒトCD81遺伝子を導入した樹立細胞の作製方法について、以下、マウスの場合を例に挙げて説明する。

【0022】HCV受容体であるヒトCD81遺伝子の全部又は一部を、プロモーターとエンハンサーとを有する発現ベクターに挿入し、構築された発現ベクターを、例えば、マウス肝癌細胞に遺伝子導入することにより作製することができる。より具体的には、ヒトCD81をコードするcDNAと、プロモーターと、エンハンサーとを含む発現ベクターを、マーカー遺伝子といっしょにマウス肝臓由来の樹立細胞にトランスフェクションし、該トランスフェクションされた細胞を培養し、ヒトCD81を安定発現する樹立細胞を選択することにより作製することができる。また、発現ベクターをマウス、ラット、ヒト等の動物由来の肝癌細胞に遺伝子導入する方法としては、従来よく知られているリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、リボソーム法、マイクロインジェクション法等を用いることができる。上記プロモーターとしては、チキン β -アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等のプロモーターを、エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス、マウスアルブミン、マウス免疫グロブリン、インスリン、SV40、c-fos等のエンハンサーを具体的に例示することができる。

【0023】上記本発明のHCV感染によりHCVを増幅しうるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物や、HCV感染によりHCVを増幅することができる非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞は、C型肝炎の生活環及びメカニズム解明の他、HCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング等に用いることができる。以下、これらヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物や非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞の用途について説明する。

【0024】上記非ヒト動物肝臓由来のヒトCD81発現細胞を用いるHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法としては、かかるヒトCD81発現細胞(細胞株)と被検物質とをインビトロで接触させる前、あるいは接触させた以降に、HCV陽性患者から得られた所定のウイルス価の血清を用いてHCVに感染させ、次いで該細胞株におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価する方法を挙げることができる。

【0025】また上記ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物を用いるHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法としては、かかる非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られる肝細胞又は肝組織を所定のウイルス価の血清の存在下で培養し、該肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価する方法や、ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、所定のウイルス価の血清を用いてHCVに感染させ、該感染後の非ヒト動物から得られる肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価する方法や、ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物をあらかじめ所定のウイルス価の血清を用いてHCVに感染させた後、該非ヒト動物から得られる肝細胞又は肝組織を被検物質の存在下で培養し、該肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価する方法や、ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物をあらかじめ所定のウイルス価の血清を用いてHCVに感染させた後、被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られる肝細胞におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価する方法を挙げることができる。

【0026】上記のHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度の測定・評価としては、肝細胞におけるHCV遺伝子の測定・評価を具体的に例示することができる。HCV遺伝子の検出や測定方法としては特に制限されるものではないが、例えばRNA抽出キット(日本ジーン社製「IsogenLS」など)を用いて、肝細胞内のRNA画分を調製し、逆転写酵素(GIBCO-BRL社製「Superscript II」など)を用いて逆転写を行い、得られるcDNAをPCRにより増幅

するRT-PCR法を挙げることができる。

【0027】また、上記ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物を用いるHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法としては、かかるヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物に被検物質を投与する前後に、所定のウイルス価の血清を用いてHCVに感染させ、該非ヒト動物におけるHCVの発現及び／又は増幅・複製の程度を測定・評価する方法を挙げることができる。特に、C型肝炎の治療剤開発のスクリーニングにおいては、HCVの感染から肝炎発症までに時間を要する場合が想定されるため、ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物にあらかじめHCVを感染させ、その後血清中のHCVの存在等を確認した後に被検物質を投与することが好ましい。そして、HCVの発現及び／又は増幅・複製の程度の測定・評価としては、非ヒト動物から得られる肝臓における肝炎の病理組織像の解析・評価や、非ヒト動物から得られる血清中のHCV遺伝子、酵素活性又は抗体価の測定・評価を挙げることができる。肝炎の病理組織像としては、門脈域におけるリンパ球を主体とした細胞浸潤と線維化、肝実質内での種々の程度の肝細胞の変性・壊死などの病態を挙げることができる。また、血清中のHCV遺伝子の測定は、前記したRT-PCRを用いることができる。

(関谷剛男他編「PCR法最新線—基礎技術から応用まで」1997年6月15日共立出版発行、270～274頁)。さらに、測定対象の血清中の酵素としては、アラニンアミノトランスフェラーゼやアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ等を例示することができ、これら血清中の酵素や抗体は常法により測定することができる。

【0028】ところで、メンデルの法則に従い出生してくる非ヒト動物には、ヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物とその同腹の野生型非ヒト動物とが含まれ、これらヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物とその同腹の野生型非ヒト動物を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型非ヒト動物、すなわちヒトCD81を細胞内で発現することができる非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えばHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質のスクリーニングに際して併用することが好ましい。

【0029】本発明のスクリーニング方法により得られるHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質は、CD81に対するアゴニスト又はアンタゴニストである可能性もある。また、HCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制物質は、C型肝炎に対する予防剤、抑制剤又は治療剤や、肝臓癌に対する抑制剤又は治療剤等に用いることができる可能性がある。例えば、上記スクリーニング方法において、HCVの感染前の被検物質の投与は、C型肝炎の予防薬剤のスクリーニングに適し

ており、反対にHCVの感染後の被検物質の投与は、C型肝炎の治療剤のスクリーニングに適している。他方、HCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質は、HCVの増殖が不十分なモデル動物において、HCVの増幅を十分に生起させたい場合などに有用であると考えられる。また、上記HCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質としては、例えば、抗体、ヒトCD81活性を有するタンパク質のリガンド、このタンパク質の断片及び断片をコードするオリゴヌクレオチド等を例示することができる。

【0030】またHCVの発現及び／又は増幅・複製の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物は、有効成分としてのHCVの発現及び／又は増幅・複製の促進物質又は抑制物質と、製剤化に必要な公知の物質を含んでいる。これらはC型肝炎等のウイルス感染症の予防、抑制及び治療目的等の医薬として使用することができるが、これらの用途に限定されるものではない。

【0031】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明の技術的範囲はかかる実施例により何ら制限されるものではない。

実施例1 (ヒトCD81発現マウス細胞株の作製)

Gene Bank上のシーケンスをもとにPCRを用いてクローニングしたヒトCD81をコードするcDNA 20 μ gを、 β -アクトチンプロモーター及びCMV-エンハンサーを有する発現ベクターpCAGGS [熊本大学医学部の山村研一教授より分与；文献(Gene 108, 193, 1991)]にサブクローンし、かかる発現ベクターを1 μ gのネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドpMC1-neo-polyA (Stratagene社製)と共にC3H [マウス肝癌細胞、東京大学の大西博士より分与]、CMT-93 (マウス結腸腺癌細胞株、ATCCより購入)、及びMMT (マウス乳癌細胞株、ATCCより購入)の各細胞株にエレクトロポレーション(400V、125 μ F)することによりトランスフェクションした。14日後、トランスフェクションした細胞を1mg/mlのG418で選択し、生残したクローンを採取し、ヒトCD81発現マウス細胞株を作製した。このヒトCD81発現マウス細胞をフィコエリトリン(PE)を結合した抗ヒトCD81抗体(Pharmingen社製)で染色し、フローサイトメトリーでヒトCD81発現テストを行った結果、各細胞においてヒトCD81が発現しているのが確認できた(図1)。

【0032】実施例2 (インビトロでのHCV結合試験)

インビボにおいて、HCV受容体であるヒトCD81はほぼ至る所に発現するが、HCVは基本的に肝細胞だけに感染することが報告されている(J. Immunol. 155, 1229, 1995)。そして、細胞へのHCV感染には、レセ

プター（ヒトCD81）とのHCVの結合、細胞へのHCVの侵入、細胞内でのHCVの増幅という少なくとも3つのステップがあり、そこで、まずHCVのヒトCD81への結合が各組織由来の細胞型によって制限されるかどうかを調べてみた。

【0033】ヒトCD81遺伝子導入によりヒトCD81を発現する実施例1で調製したC3H、CMT-93及びMMTの各 10^5 細胞と、ヒトCD81遺伝子未導入のヒトCD81を発現しないC3H、CMT-93及びMMTの各 10^5 細胞とを、HCV陽性患者由来の 10^7 以上のウイルス価を有する新鮮な血清といっしょに37℃で1時間インキュベートした。これら細胞を常法により溶解して、全RNAを単離した。肝臓、乳腺、結腸に由来する各細胞型から単離されたRNAの10%を用いてRT-PCRを行った。まず、上記単離した全RNA（ $\sim 1\mu\text{g}$ ）を用い、文献（Science 244, 359, 1989）記載のHCVの塩基配列をもとに作製した+鎖特異的なプライマーと逆転写酵素（rTth DNA polymerase; パーキンエルマー社製）によりcDNAを合成し、この逆転写反応混合液に含まれるcDNAを鋳型として2段

階のPCRを行いcDNAを増幅させ（各30サイクル）、このPCR産物の10%をアガロースゲル電気泳動（3%）にかけ、HCV(+)鎖を検出した。なお、PCR反応におけるプライマーも上記文献（Science 244, 359, 1989）記載のHCVの塩基配列をもとに作製したものをを用いた。結果を表1に示す。

【0034】表1から、ヒトCD81遺伝子未導入のC3H、CMT-93及びMMTの各細胞ではいずれの細胞型においてもHCVの結合がみられず、CD81へのHCV結合の種特異性を示す従来の報告と一致した。一方、ヒトCD81を導入したヒトCD81を発現するC3H、CMT-93及びMMTの各細胞では、いずれの細胞型においてもHCVと結合することが明らかとなった。これらのことから、HCVレセプターであるヒトCD81へのHCVの結合は、肝臓、乳腺、結腸等の組織に特異的なものでなく、あらゆる組織の細胞に発現したヒトCD81に結合することがわかった。

【0035】

【表1】

	細 胞					
	C3H		CMT-93		MMT	
	hCD81	hCD81	hCD81	hCD81	hCD81	hCD81
	+	-	+	-	+	-
HCVへの結合	有り	無し	有り	無し	有り	無し

【0036】実施例3（インビトロでのHCV感染試験）

次に、ヒトCD81に結合したHCVがヒトCD81発現マウス細胞内に侵入できるかどうか、侵入後に該細胞内で増幅できるかどうかについて検討した。実施例2と同様に、ヒトCD81遺伝子を導入したC3H、CMT-93及びMMTの各細胞とヒトCD81遺伝子未導入のC3H、CMT-93及びMMTの各細胞を用い、これら各 10^4 細胞を、 10^7 以上のウイルス価を有するHCV含有血清の存在下又は非存在下で6日間培養し、生残した細胞を溶解して全RNAを単離し、この単離した全RNA（ $\sim 1\mu\text{g}$ ）を用い、特異的プライマー〔5'-TTCTAGTCGCGCGCACACC-3'（配列番号1）〕と逆転写酵素（rTth DNA polymerase; パーキンエルマー社製）によりcDNAを合成し、この逆転写反応混合液に含まれるcDNAを鋳型として

2段階のPCRを行いcDNAを増幅させ（各30サイクル）、このPCR産物の10%をアガロースゲル電気泳動（3%）にかけ、HCV(-)鎖を検出した。なお、PCR反応におけるプライマーの組合せとしては、1段階目のPCRでは〔1st-F: 5'-CCATGGCGTTAGTATGAGTG-3'（配列番号2）、1st-R: 5'-GTGCTCATGGTGACGGTCTA-3'（配列番号3）〕、2段階目のPCRでは〔2nd-F: 5'-AGAGCCATAGTGGTCTGCGGA-3'（配列番号4）、2nd-R: 5'-CTTTCGCGACCCAACACTAC-3'（配列番号5）〕をそれぞれ用いた。結果を表2に示す。

【0037】

【表2】

	細 胞					
	C3H		CMT-93		MMT	
	hCD81	hCD81	hCD81	hCD81	hCD81	hCD81
	+	-	+	-	+	-
HCV (-) 鎖	有り	無し	無し	無し	無し	無し

【0038】表2からもわかるように、乳腺（CMT-93）及び結腸（MMT）由来のヒトCD81発現又は

非発現のいずれの細胞からもHCV(-)鎖は検出できず、これに対して、ヒトCD81発現肝癌細胞（C3

H) からはHCV(-)鎖が著量検出できたが、ヒトCD81非発現肝癌細胞(C3H)からは何らHCV(-)鎖が検出できなかった。これらのことから、HCVは、ヒトCD81を発現するいずれの組織のマウス細胞とも結合するが、肝細胞においてのみ増幅することがわかった。

【0039】実施例4(マウスCD81が欠損したヒトCD81トランスジェニックマウスの作製)
実施例1により得られたヒトCD81発現ベクター(pCAGGS-hCD81 plasmid vector)を制限酵素SallIとHindIIIとを用いて切断し、アガロースゲル電気泳動後、およそ2.5kbのDNA断片(図2)をGene CleanII kit(Bio101社製)を用いて精製し、この精製したDNAを2ng/mlの濃度になるように蒸留水で希釈し、F1マウス(C57BL/6マウス×DBA/2マウス)の受精卵に注入し、以後常法によりトランスジェニックマウスを作製した。このようにして得られた3匹のヒトCD81トランスジェニックマウスのうち2匹を用い、これらをマウスCD81欠損マウスと戻し交配させ、4タイプのマウス、すなわちヒトCD81+/マウスCD81-(H+M-)、ヒトCD81-/マウスCD81-(H-M-)、ヒトCD81+/マウスCD81+(H+M+)及びヒトCD81-/マウスCD81+(H-M+)を作製した。上記ヒトCD81+/マウスCD81-(H+M-)タイプのマウスは、マウスCD81が欠損したヒトCD81トランスジェニックマウスである。なお、これらマウスのタイプは、戻し交配により得られたマウスから末梢血液細胞を採取し、この末梢血液細胞の白血球を抗ヒトCD81抗体又は抗マウスCD81抗体(Pharmingen社製)で染色し、末梢血液細胞上のヒトCD81及びマウスCD81の発現をフローサイトメトリーで測定することによって決定した。

【0040】実施例5(インビボでのヒトCD81トランスジェニックマウスへのHCV感染)
ヒトの場合は、HCV(+)-血液の輸血後のHCV感染及び肝傷害の進行は、レシピエント、ウイルスのタイプ又はウイルスの投与量等のような多くのパラメータに

よって異なり、何人かの患者は繰り返し注入した後、肝炎を引き起こすことが知られている。また、HCVウイルス価が高い患者でさえも、ALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)及びAST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)濃度では診断することができないくらい非常に緩慢な進行の肝傷害を引き起こすことが知られている。従って、マウスにおける病気の進行を予測するのは非常に困難である。そこで、ALT及びAST濃度の測定他に、肝細胞におけるHCVの存在及び増幅の測定を併せて実施した。

【0041】実施例4により得られた2タイプのヒトCD81トランスジェニックマウス(H+M-及びH+M+)に導入された遺伝子の発現をノーザンブロット法により調べた結果、肝臓を含む全ての組織で形質転換ヒトCD81遺伝子の転写(mRNA)を検出することができた(図3)。そこで、5~6週齢の4タイプのマウス(H+M-、H-M-、H+M+、H-M+)全てに、HCV陽性患者の10⁷以上のウイルス価を有する新鮮な血清を静脈注射しHCVを感染させた。感染後の所定の期間後毎に各マウスの血液を採取し、肝細胞傷害のマーカーであるALT及びASTの濃度を測定した。注射後90日までは、これらマウスにおいて血清中のASTやALTの濃度はいずれも上昇していなかった。

【0042】実施例6(RT-PCRによる血清内のHCV存在の評価、並びに肝細胞内におけるHCVの存在及び増幅の測定)

実施例5により得られた2タイプのヒトCD81トランスジェニックマウス(H+M-及びH+M+)のHCV感染後90~120日の肝細胞内におけるHCVの存在をマウスの肝組織から単離したRNAの増幅についてRT-PCR法により調べてみた。これらマウスから肝臓を摘出し、常法により肝細胞を採取し、該細胞を溶解した後、実施例3と同様にしてHCVの増幅を示すHCV(-)鎖を測定した。同様にして、トランスジーンネガティブマウス(H-M-及びH-M+マウス)についてもHCV(-)鎖を測定した。結果を表3に示す。

【0043】

【表3】

	トランスジェニックマウス肝臓			
	H+M+	H+M-	H-M+	H-M-
HCV (-) 鎖	+	+	-	-

【0044】表3から、上記ヒトCD81トランスジェニックマウス由来の肝臓でHCV(-)鎖を検出し、肝細胞内においてHCVが増幅することがわかった。一方、トランスジーンネガティブマウス(H-M-及びH-M+マウス)ではHCVの増幅を示すHCV(-)鎖を検出することができなかった。これらのことから、ヒトCD81トランスジェニックマウスでは、肝細胞特異的にHCV感染が生じ、HCVが肝細胞内で増幅することが明

らかとなった。

【0045】

【発明の効果】本発明によると、C型肝炎の感染・発症機構の解明や、C型肝炎の予防・治療剤等のスクリーニングに有用であるC型肝炎モデルを提供することができる。また、かかるC型肝炎モデルを用いて、C型肝炎の予防・治療剤等を開発することができる。

【0046】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY LIMITED
 <120> Cells and non-human animals in which HCV replicate
 <130> 132695
 <140>
 <141>

<160> 5
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:specific primer
 <400> 1
 ttcttagtcg cgcgacacc 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR primer
 (1st)
 <400> 2
 ccatggcggtt agtatgagtg 20
 <210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer
 (1st)
 <400> 3
 gtgctcatgg tgcacggtct a 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer
 (2nd)
 <400> 4
 agagccatag tggctctgcgg a 21
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer
(2nd)

<400> 5

ctttcgcgac ccaacactac

20

【図面の簡単な説明】

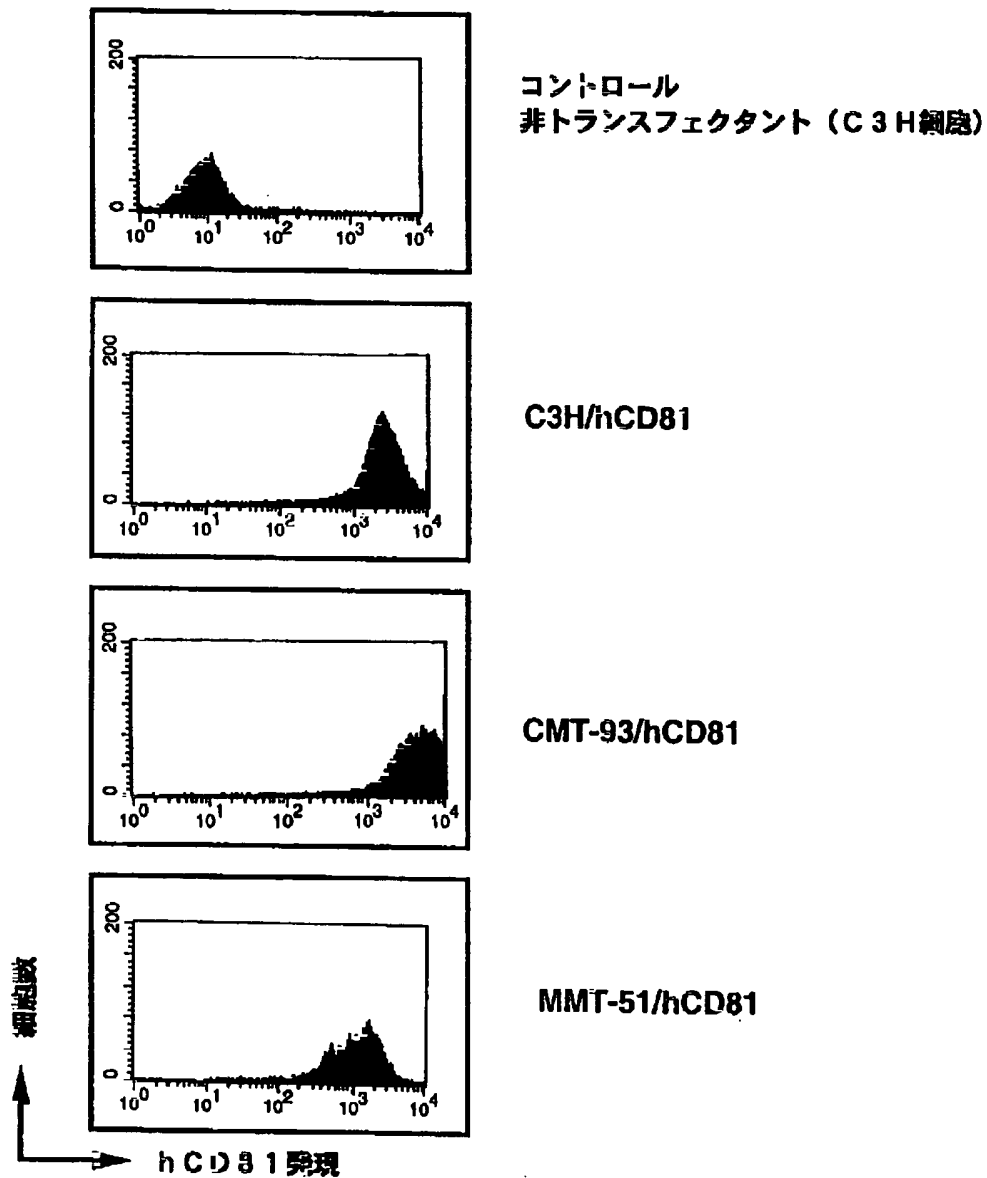
【図1】マウス肝癌細胞、マウス結腸腺癌細胞株及びマウス乳癌細胞株におけるヒトCD81の発現を示す図である。

【図2】本発明に用いた発現ベクターの遺伝子構造を示

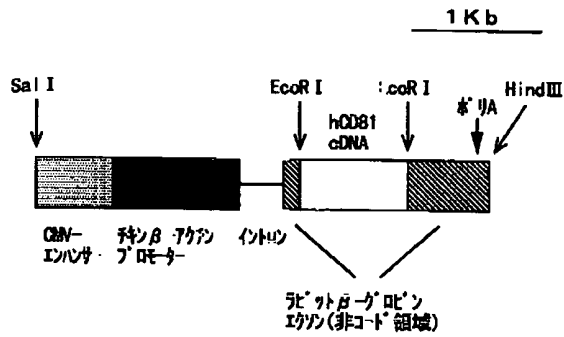
す図である。

【図3】本発明のヒトCD81トランスジェニック非ヒト動物の各組織における導入された遺伝子発現の結果を示す図である。

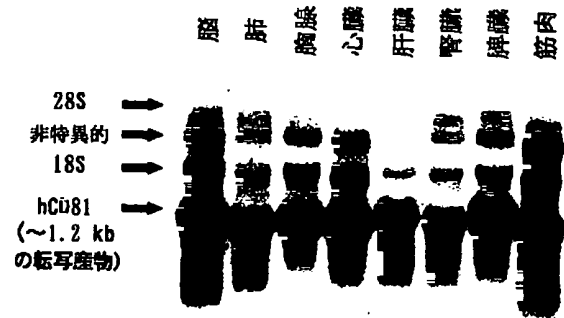
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

(参考)

C 1 2 Q 1/48

C 1 2 N 7/00

1/70

C 1 2 P 21/02

C

// C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 5/00

B

C 1 2 P 21/02

15/00

Z N A A

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA63 CA04 DA02
 EA04 FA02 FA06 FA10 GA12
 GA14 GA18
 4B063 QA01 QA05 QQ03 QQ08 QQ10
 QQ26 QQ42 QQ61 QR77 QR79
 QR80 QS11 QS24
 4B064 AG20 CA10 CA19 CC24 DA15
 4B065 AA90X AA90Y AA96X AB01
 BA03 BA25 BB37 CA24 CA44
 CA46
 4C084 AA16 ZB331 ZB332